

## IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA NO LÍQUIDO AMNIÓTICO DE ÉGUAS NO MOMENTO DO PARTO

ILUSCA SAMPAIO FINGER<sup>1</sup>; CARLOS EDUARDO WAYNE NOGUEIRA<sup>2</sup>; CLÁUDIA HAETINGER<sup>3</sup>; LORENA SOARES FEIJÓ<sup>4</sup>; FERNANDA MARIA PAZINATO<sup>5</sup>; BRUNA DA ROSA CURCIO<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – [ilusca-finger@hotmail.com](mailto:ilusca-finger@hotmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – [cewn@terra.com.br](mailto:cewn@terra.com.br)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – [cloue\\_haet@hotmail.com](mailto:cloue_haet@hotmail.com)

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas – [lolo.feijo@hotmail.com](mailto:lolo.feijo@hotmail.com)

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas – [fernandampazinato@yahoo.com.br](mailto:fernandampazinato@yahoo.com.br)

<sup>6</sup> Universidade Federal de Pelotas – [curciobruna@hotmail.com](mailto:curciobruna@hotmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

O líquido amniótico no início da gestação é produzido a partir de secreções do epitélio amniótico e da urina fetal. Posteriormente, com o desenvolvimento da gestação, o esfíncter vesical impede a liberação da urina fetal para a cavidade amniótica e a saliva e as secreções nasais fetais passam a fazer parte da composição do líquido amniótico (BAETZ et al., 1976). As funções vitais para o desenvolvimento e a manutenção da vida fetal como a oxigenação, nutrição e a remoção das excretas nitrogenadas são realizadas pela circulação placentária (GUINTER, 1998; PRESTES, 2006). Neste contexto, o líquido amniótico desempenha papel fundamental na gestação como no parto das éguas (ZANELLA et al., 2013).

As proteínas de fase aguda são cada vez mais utilizadas no diagnóstico e prognóstico nas doenças dos animais domésticos (CANISSO et al., 2014). Em resposta a infecção ou injúria, essas proteínas são rapidamente liberadas na corrente sanguínea e suas concentrações são diretamente relacionadas com a severidade da condição inflamatória do animal (CRISMAN, 2008).

A avaliação do líquido amniótico no momento do parto é um método pouco invasivo e ágil capaz de demonstrar processos de comprometimento da placenta e feto. Poucos são os estudos clínicos desenvolvidos em líquido amniótico de equino e não há relatos na literatura da realização de proteinograma em fluidos fetais. Desta forma, o objetivo deste estudo é identificar proteínas da fase aguda no líquido amniótico de éguas no momento do parto.

### 2. METODOLOGIA

Este estudo foi realizado em um criatório de cavalos da Raça Puro Sangue Inglês, localizado no município de Bagé, sul do Brasil, latitude 31°34'48.54" e longitude 54°11'06.38". As éguas eram mantidas durante o verão em campo nativo e durante o inverno a consorciação de azevém (*Lolium multiflorum*), trevo branco (*Trifolium repens*) e cornichão (*Lotus corniculatus*) como pastagem cultivada. A suplementação era realizada através de ração balanceada com garantia de 12% de proteína e 27,5% Mcal de energia digerível. A água estava disponível *ad libitum*.

Foram utilizadas trinta e seis éguas gestantes, saudáveis, entre 5 e 21 anos de idade, apresentando o mesmo padrão de escore corporal. As éguas foram divididas em dois grupos de acordo com MADILL (2002): o grupo 1 (n= 18), éguas

jovens, com idades entre cinco e oito anos ( $6,72 \pm 0,26$ ) e o grupo 2 ( $n= 18$ ), éguas com idade superior a nove anos ( $13,9 \pm 0,81$ ).

Após o rompimento da bolsa alantoideana e exposição da membrana amniótica, as éguas foram conduzidas às cocheiras maternidade para que todos os partos fossem assistidos. Todos os partos foram eutócicos com o nascimento de potros viáveis.

As placentas foram inspecionadas e pesadas imediatamente após a expulsão. O peso médio das placentas foi de  $6,7 \pm 0,2$  Kg. Para avaliação macroscópica, as placentas foram dispostas em formato de “F”, conforme descrito por SCHLAFER (2004). Todas as éguas utilizadas neste estudo apresentaram padrão histopatológico das placentas sem alteração, de acordo com a avaliação descrita por LINS et al. (2012).

A coleta do líquido amniótico foi realizada através de punção direta da vesícula amniótica, com seringa de 20mL e agulha (40x12 mm) estéril (método de amniocentese), assim que exposta a bolsa amniótica na primeira fase do parto. O material foi imediatamente transferido para tubos falcon® de 15 mL e estocado em freezer sob temperatura de  $- 20^{\circ}\text{C}$  para posterior avaliação.

O proteinograma do líquido amniótico foi obtido pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE), no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária - FCAV - UNESP, Jaboticabal, conforme método descrito por Laemmli (1970) e as recomendações de FAGLIARI; SILVA (2002).

Os pesos moleculares e as concentrações das proteínas foram determinados mediante leitura em densitômetro computadorizado (Densitometer CS9301- PC - Shimadzu, Tokyo-Japan). Para a identificação das proteínas no gel, foi utilizada solução marcadora (Sigma Marker, Wide Range – Saint Louis, USA) com diversos pesos moleculares, variando de 20.000 a 200.000 dáltons.

A análise estatística foi realizada com auxílio do software Statistix8.0® (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA). Os valores das proteínas de fase aguda foram expressos em média  $\pm$  erro padrão. As comparações entre as médias das proteínas de fase aguda entre os grupos foram realizadas pelo teste Two Sample T Test. Foi realizado para todas as variáveis respostas o teste de correlação de Pearson. O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar os índices de éguas que apresentaram proteínas inflamatórias entre os grupos de idade.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observada correlação entre as proteínas inflamatórias identificadas no líquido amniótico.

No traçado densitométrico foram detectadas no líquido amniótico vinte e duas proteínas com pesos moleculares variando 19,439 a 272,284 dáltons (Da). Destas, dez proteínas foram consideradas para o estudo, por serem imunoglobulinas e proteínas de fase aguda. Assim nas 36 éguas utilizadas para essa análise, destacaram-se com respectiva percentagem no fluido amniótico a albumina ( $n=36$ ; 100%), transferrina ( $n=35$ ; 97,22%), IgG cadeia leve ( $n=33$ ; 91,7%), IgG cadeia pesada ( $n=30$ ; 83,33%), IgA ( $n=30$ ; 83,3%), haptoglobina ( $n=22$ ; 61,11%), ceruloplasmina ( $n=21$ ; 58,3%),  $\alpha_1$  - antitripsina ( $n=13$ ; 36,11%),  $\alpha_1$  - glicoproteína ácida ( $n=7$ ; 20%) e 23 kDa ( $n=2$ ; 5,6%). As concentrações destas dez proteínas, apresentadas pela média, juntamente com seus respectivos erros padrões, valores mínimos e máximos dos pesos moleculares, encontram-se na Tabela 1.

Em estudos realizados por CANISSO et al. (2014) e COUTINHO et al. (2013), os autores demonstraram um aumento nos níveis séricos das proteínas inflamatórias haptoglobina e Amilóide A sérica, em éguas com alterações inflamatórias na placenta. No líquido amniótico de equinos, não há relato da avaliação de proteínas de fase aguda. A albumina demonstrou estar presente em todas (100%) as amostras ( $177,01 \pm 30,58$  mg/dL). A proteína identificada com peso molecular de 23 kDa ( $7,50 \pm 3,35$  mg/dL) apresentou o menor percentual e foi identificada em apenas duas amostras (5,6%).

**Tabela 1.** Média, Erro Padrão das Concentrações, Valores Mínimo e Máximo do Peso Molecular das proteínas identificadas no líquido amniótico no momento do parto (N=36).

Proteínas de Fase Aguda (mg/dL)	N	Média $\pm$ S.E	Valores Mínimo-Máximo (Da)
Albumina	36	177,01 $\pm$ 30,58	63,74 – 69,76
Transferrina	35	37,98 $\pm$ 9,47	80,53 – 89,32
IgG Cadeia Leve	33	148,99 $\pm$ 39,90	23,80 – 40,60
IgG Cadeia Pesada	30	10,43 $\pm$ 2,63	23,88 – 61,72
IgA	30	1,10 $\pm$ 0,51	151,54 – 194,12
Haptoglobina	22	17,47 $\pm$ 12,88	40,70 – 56,97
Ceruloplasmina	21	0,39 $\pm$ 0,10	93,40 – 120,40
$\alpha_1$ – Antitripsina	13	15,21 $\pm$ 9,10	59,41 – 64,30
$\alpha_1$ – glicoproteína ácida	7	0,24 $\pm$ 0,08	33,86 – 41,40
23 kDa	2	7,50 $\pm$ 3,35	23,30 – 23,42

Na comparação entre os grupos de idade, não foi observada diferença na porcentagem de éguas em que foram identificadas as proteínas inflamatórias. Na avaliação da concentração das proteínas entre os grupos, somente a transferrina apresentou diferença ( $p=0,01$ ), sendo detectadas médias superiores no grupo de éguas jovens ( $47,8 \pm 14,2$ ) em relação às éguas mais velhas ( $10,3 \pm 3,7$ ).

A transferrina, proteína de fase aguda negativa, apresentou um valor significativamente inferior no grupo de éguas mais velhas. Apresentando um padrão similar ao descrito sobre as concentrações de albumina, em vacas multíparas, o que pode representar um marcador de processos inflamatórios associados a processos reprodutivos no pós-parto (KRAUSE et al., 2013).

#### 4. CONCLUSÕES

Foi possível identificar proteínas inflamatórias no líquido amniótico de éguas saudáveis no momento do parto. Somente a transferrina apresentou-se diferente entre os grupos de idade, com concentrações menores no grupo de éguas mais velhas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAETZ, A.L.; HUBERT, W.T.; GRAHAM, C.K. Changes of biochemical constituents in Bovine fetal fluids with gestoterial age. **Am J Vet. Res.**, v. 37, 1976.

CANISSO, I.C.; BALL, B.A.; TROEDSSON, M.H. *et al.* Acute phase proteins and total leukocyte counts in blood of mares with experimentally induced ascending placentitis. **Journal of Equine Veterinary Science.**, v. 34, p. 215, 2014.

COUTINHO DA SILVA, M.A.; CANISSO, I.C.; MACHPHERSON, M.L. *et al.* Serum amyloid A concentration in healthy periparturient mares and mares with ascending placentitis. In: **Equine Veterinary Journal.**, p. 1-6, 2013.

CRISMAN, M.V.; SCARRATT, W. K.; ZIMMERMAN, K.L.: Blood Proteins and Inflammation in the Horse. **Vet Clin Equine.**, v. 24, p. 285–297, 2008.

FAGLIARI, J.J.; SILVA, S.L. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hígidos e de eqüinos acometidos por abdômem agudo, antes e após laparotomia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.54, p.559-567, 2002.

GUINTER, O.J. Equine Pregnancy: Physical Interactions Between the Uterus and Conceptus. In: **AAEP Proceedings.**, 1998. v. 44, p. 73-104.

KRAUSE, A.R., PFIFER, L.F.M., MONTAGNER, P. *et al.* Association between resumption of postpartum ovarian activity, uterine health and concentrations of metabolites and acute phase proteins during the transition period in Holstein cows. **Animal Reproduction Science.**, v. 145, p. 8-14, 2014.

LINS, L.; FINGER, I.S.; FERNANDES, C.G. *et al.* Resposta clínica e metabólica de potros neonatos em relação aos achados histopatológicos da placenta na égua. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v. 64, p.1436-1441, 2012.

MADILL, S. Reproductive Considerations: mare and stallion. **Vet. Clin. Equine.**, v. 18, p. 591 – 619, 2002.

SCHLAFER, D.H. Postmortem examination of the equine placenta, fetus, and neonate: Methods and interpretation of findings. In: **AAEP Proceedings.**, 2004. v. 50, p. 144-161.

ZANELLA, L.F.; TAKAHIRA, R.K.; MELO, C.M.; *et al.* Biochemical profile of amniotic and allantoic fluid during different gestational phases in mares. **Journal of Equine Veterinary Science.**, p.1-4, 2013.